Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.3, Fall 2020, P. 427-438
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۴۳۸-۴۲۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله علمی-پژوهشی

مطالعه سازگاری برخی ارقام و یک ژنوتیپ ایرانی آلبالو با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و فلورسنس میکروسکوپی

عباس جولانی[۱]- یاور شرفی[۲]*- جواد صباغ پور هریس[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱

چکیده

آلبالو (*Prunus cerasus* L.) متعلق به خانواده Rosaceae، زیر خانواده پرونوئیده، یکی از مهمترین میوه‌های هسته‌دار مناطق معتدله می‌باشد. ایران بعد از کشورهای ترکیه و آمریکا سومین کشور تولید کننده آلبالو در دنیا است. اگرچه اکثر ارقام آلبالو خودسازگار می‌باشند ولی اخیراً ارقام خودناسازگار یا کمی خودناسازگار گزارش شده و به مرور زمان بر تعداد آن‌ها افزوده می‌شود. در این مطالعه روابط خود و دگر(نا)سازگاری برخی ارقام و دو ژنوتیپ برتر ایرانی آلبالو، با استفاده از ردیابی نفوذ لوله گرده در خامه با میکروسکوپ فلورسنت، و روش PCR با آغازگرهای دیجنریت بررسی شد. ارقام شامل ارقام 'متئور'، 'مونت مورنسی'،'محلی'،'مجارستانی دیررس' و یک ژنوتیپ برتر گزینش شده از مناطق مختلف ایران بویژه استان‌های آذربایجان شرقی و غربی بودند. در مطالعه میکروسکوپی، ترکیب تلاقی‌ها بر اساس همپوشانی گلدهی ارقام و ژنوتیپ انتخابی صورت گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که در تلاقی 'محلی' X 'مونت مورنسی' بیشترین تشکیل میوه نهایی (۱۵/۵ درصد) مشاهده گردید. درهمه تلاقی‌ها تعداد لوله گرده از کلاله تا ورودی تخمدان کاهش یافت. همچنین، نتایج مربوط به شناسایی آلل‌های ناسازگاری نشان دادند که در هیچکدام از ارقام و ژنوتیپ مورد مطالعه تمامی آلل‌ها یکسان نبودند و این نشانگر سازگاری همه آن‌ها با همدیگر بود. بطور کلی نتایج هر دو روش همدیگر را تایید و نشان داد که همه ارقام و ژنوتیپ انتخابی را می‌توان در احداث باغات آلبالو با هم کشت نمود.

واژه‌های کلیدی: آلبالو، آلل ناسازگاری، خودناسازگاری، میکروسکوپ فلورسنت، روابط سازگاری

مقدمه

آلبالو از جمله میوه‌های مهمی است که دارای استفاده‌های متعدد تغذیه‌ای، دارویی و بهداشتی است و افزایش تولید آن به عنوان یک محصول استراتژیک نیازمند توجه بیشتری می‌باشد (۲۷). اکثر ارقام و ژنوتیپ‌های آلبالو خودسازگار هستند ولی اخیراً ارقام خودناسازگار آن گزارش شده‌اند. بنابراین، برای گرده‌افشانی، تلقیح و تولید محصول تجاری، نیازمند دانه گرده سازگار با مادگی خود می‌باشند. ایران دارای تنوع نسبتاً بالایی از درختان آلبالو بوده و غنی از منابع ژنتیک این ژرم‌پلاسم می‌باشد (۳، ۵، ۱۲، ۱۸ و ۲۷). به دلیل آلوتتراپلوئید بودن آلبالو که باعث پیچیده‌تر شدن تفرق صفت خودناسازگاری در نتاج می‌شود مطالعات کمتری در ارتباط با روابط سازگاری ارقام و ژنوتیپ‌های آن در ایران صورت گرفته است (۲۷، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۴۱ و ۴۲).

برای شناسایی سازگاری بین ارقام و ژنوتیپ‌ها از روش‌های گرده‌افشانی کنترل شده در مزرعه و محاسبه درصد میوه‌بندی، گرده‌افشانی کنترل شده در آزمایشگاه و بررسی نفوذ لوله گرده در خامه از طریق میکروسکوپ فلورسنت و روش‌های مختلف مولکولی (۱۵، ۱۶، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳) استفاده می‌شود. جهت ارزیابی وضعیت سازگاری یک رقم یا ژنوتیپ خاص و انتخاب بهترین گرده‌زا برای آن، گرده‌افشانی کنترل شده در شرایط مزرعه و محاسبه درصد میوه‌بندی چند هفته پس از گرده‌افشانی، به عنوان یک روش متداول مورد استفاده قرارمی‌گیرد. این روش به دلیل تاثیر عوامل محیطی مختلف از دقت پایینی دارد و به دلیل طولانی بودن سن نونهالی درختان میوه بسیار زمان‌بر و نیاز به درختان بالغ است. همچنین، در شرایط آزمایشگاهی با ایجاد شرایط کنترل شده از لحاظ دما، رطوبت و فتوپریود و ردیابی نفوذ لوله گرده در درون خامه با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، می‌توان سازگاری گرده با مادگی را در ارقام

۱، ۳ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد میوه‌کاری و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: y.sharafi@shahed.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhorts4.v34i3.78796

مختلف بررسی کرد. از آنجا که چنین آزمایش‌هایی کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند، نسبت به روش قبلی دارای دقت بیشتری بوده و به زمان کمتری نیاز دارند ولی وضعیت باردهی و خصوصیات میوه در این روش قابل پیگیری نیست (۱، ۴، ۶، ۷، ۱۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷ و ۳۰).

اخیراً مطالعه سازگاری بین ارقام مختلف درختان میوه از طریق شناسایی آلل‌های S با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی به عنوان یک روش جدید، ارزان و سریع مورد توجه بیشتری قرار گرفته که تحت تاثیر شرایط محیطی و نونهالی قرار نمی‌گیرد. به طوریکه حتی پس از جوانه‌زنی بذر و خروج اولین برگ‌ها در آزمایشگاه، می‌توان DNA گیاهان را استخراج کرده و اقدام به شناسایی گروه‌های سازگار، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با روش PCR کرد. دو رقم یا ژنوتیپ در صورتی که دارای آلل‌های ناسازگاری مشابه باشند از نظر گرده‌افشانی به عنوان ارقام دگرناسازگار تلقی شده و نمی‌توانند در احداث باغ با هم کشت شوند. ولی در صورت داشتن آلل‌های ناهمسان با هم سازگار بوده و می‌توانند با هم کشت شوند. این روش در سیب، گلابی، گیلاس، آلبالو، زردآلو، آلو، بادام و اکثر درختان میوه دیگر که ناسازگاری در آنها مطرح بوده به طور موفقیت‌آمیزی کاربردی شده است و آغازگرهای ویژه نیز برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در این گیاهان طراحی و به کار گرفته شده‌اند (۳۱، ۳۲، ۳۳ و ۳۴).

با توجه به آلوتتراپلوئید بودن ارقام و ژنوتیپ‌های آلبالو سیستم خودناساگاری آن بسیار پیچیده‌تر از گیاهان دیپلوئید می باشد. چون پلی پلوئید باعث از بین رفتن خودناسازگاری می شود و در برنامه های اصلاحی گیاهان خودناسازگار بعنوان یکی از روشهای غلبه بر خودناساگاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین، در حالت پلی پلوئیدی ممکن است برخی از آلل‌های ناسازگاری غیر فعال شوند و یا بخاطر جهش به صورت سازگار بیان شوند. بنابراین، با احتساب متفاوت بودن هر چهار آلل ناسازگاری، گرده‌های آلبالو بصورت دیپلوئید و با شش ژنوتیپ ظاهر می‌شوند که در صورت فعال بودن همه آلل‌ها خودناسازگاری ۱۰۰ درصد خواهد بود ولی در صورت غیر فعال بودن یک آلل و یا چند آلل حالت‌های مختلفی ایجاد می‌شوند (۲، ۸، ۹، ۱۳، ۱۴، ۲۴ و ۲۷). در حالت تتراپلوئید دانه‌های گرده بجای دو ژنوتیپ در حالت دیپلوئید، شش ژنوتیپ تولید می‌کنند. بنابراین، برخلاف حالت دیپلوئید که در صورت یکسان نبودن فقط یک آلل گرده با مادگی ۵۰ درصد گرده‌ها منجر به لقاح می‌شوند در حالت تتراپلوئید در صورت غیر فعال بودن هردو آلل (در گرده و مادگی) تنها یک ششم گرده‌ها قدرت تلقیح پیدا می‌کنند (۱۱، ۱۶، ۱۹، ۲۵ و ۳۸).

تا بحال در مورد شناسایی روابط سازگاری بین ارقام و ژنوتیپ های آلبالو تحقیقاتی انجام و گروههای خودسازگار و خودناسازگار گزارش شده‌اند (۱۷، ۱۹، ۲۰، ۲۴، ۳۱، ۳۰، ۳۲ و ۴۳). اولین بار با مطالعه میکروسکوپی، ناسازگاری ارقام Tschernokorka و Crisanaآلبالو را نشان دادند (۱۷). سپس برای اولین بار حضور S–ریبونوکلئازها در خامه ارقام آلبالو گزارش شد (۴۲). توبوت (۳۸) با مطالعه میکروسکوپی همچنین، با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های خامه، ناسازگاری ارقام تتراپلوئید آلبالو شامل ‘Cacˇanski ‘Ujfehertoi،ˇanskiRubin’, ‘Erdi Botermo B’, ‘KoroD’ و FurtoD’ را نشان دادند (۳۲). همچنین، در تحقیقی برخی آلل‌های ناسازگاری غیر فعال در برخی ارقام آلبالو شناسایی و توالی‌یابی شدند (۳۱). آلل های ناسازگاری ارقام اروپایی در مطالعه‌ای شناسایی شد (۱۷). همچنین در تحقیق مشابه برخی آلل های ناسازگاری غیر فعال در برخی ارقام آلبالو شناسایی و توالی‌یابی شدند (۲۲).

هدف تحقیق حاضر تعیین روابط سازگاری گرده با مادگی چند رقم و ژنوتیپ برتر آلبالو با استفاده از گرده‌افشانی کنترل شده در مزرعه و آزمایشگاه و در نهایت با روش PCR بود. تا بطور دقیق وضعیت خود(نا)سازگاری و دگر(نا)سازگاری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه جهت توصیه برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و یا احداث باغ‌های آلبالو در کشور مشخص شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ارقام ’منتئور‘،’مونت مورنسی‘،’محلی‘ آذربایجان غربی، مجارستانی دیررس‘ و یک ژنوتیپ گزینش شده ایرانی از استان آذربایجان شرقی بودند که همگی در یک باغ خصوصی در کرج روی پایه محلب پیوند شده بودند. روابط سازگاری آنها با روش‌های گرده‌افشانی کنترل شده در باغ و آزمایشگاه و PCR بررسی شد.

در روش گرده‌افشانی کنترل شده در باغ چهار شاخه مناسب در چهار جهت اصلی شمال، جنوب، شرق و غرب درخت انتخاب شدند. یادآور می‌شود که انتخاب ارقام و ژنوتیپ‌های گرده‌زا بر اساس همپوشانی گلدهی پایه‌های مادری و پایه‌های پدری بکار رفته در تحقیق انجام شد به گونه‌ای که پایه‌های پدری بکار رفته برای تلقیح هر پایه مادری یک الی دو روز قبل از پایه مادری شکوفا شود.

برای جمع‌آوری دانه گرده، گل‌های با کیفیت بالا و آزمون جوانه‌زنی دانه‌های گرده به روش اورتگا و همکاران (۲۳) عمل شد. با توجه به آلوتتراپلوئیدی آلبالو که عامل از بین رفتن خودناسازگاری گامتوفیتیک بوده و اکثر ارقام آلبالو بصورت کامل یا قسمتی خودبارور هستند، لازم بود که همه گیاهان مادری اخته شوند. گل‌های اخته شده در پایان بوسیله کیسه‌های پارچه‌های ململ به ابعاد۷۰×۵۰ سانتیمتری پوشانیده شدند. پس از آخرین گرده‌افشانی، تعداد گل‌های گرده‌افشانی شده در هر شاخه ثبت و کیسه‌ها مجدداً روی شاخه‌ها

قرار گرفتند (۲۵). به منظور تعیین درصد تشکیل میوه و همچنین ریزش گل‌های گرده‌افشانی شده در چهار نوبت بعد از عمل گرده-افشانی نتایج ثبت گردید. بدین ترتیب که کیسه‌ها باز شده و گل‌های گرده‌افشانی شده بطور جداگانه در هر رقم شمارش شدند. با توجه به تعداد گل‌های گرده‌افشانی شده در هر شاخه، در هر شمارش درصد میوه‌های تشکیل شده ملاک تجزیه آماری قرار گرفت. شمارش میوه‌ها در سه نوبت بعد از گرده‌افشانی انجام شد. شمارش اول ۱۶ روز، شمارش دوم ۴۲ روز، شمارش سوم ۹۰ روز پس از گرده‌افشانی انجام گرفت (۲۵).

برای بررسی فلورسنس میکروسکوپی در این بخش نیز تلاقی‌ها مثل روش قبلی صورت گرفت و جهت مطالعات میکروسکوپی، مادگی‌های تلاقی شده در مزرعه پنج روز پس از گرده‌افشانی از شاخه‌ها جدا و به آزمایشگاه منتقل شده و در محلول فیکساتور (FAA) شامل پنج درصد فرمالدئید پنج درصد، پنج درصد اسیداستیک‌گلاسیال و ۹۰ درصد الکل اتیلیک ۷۰ درصد تثبیت شدند (۲۵). سپس مادگی‌ها از محلول فیکساتور خارج شده و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس در داخل ویال‌های شیشه‌ای حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سولفاید سدیم ۵ درصد قرار گرفتند. در مرحله بعد به منظور نرم شدن بافت مادگی از محلول هیدروکسید سدیم استفاده شد. سپس رنگ‌آمیزی مادگی‌ها با محلول آنلین بلو به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت. مادگی‌ها از محلول سولفاید سدیم خارج شده و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند و بعد به منظور رنگ‌آمیزی لوله‌های گرده به مدت ۱۰ تا ۱۵ ساعت داخل محلول رنگی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که اطراف ویال‌های شیشه‌ای حاوی مادگی‌ها برای جلوگیری از نفوذ نور به داخل با فویل آلومینیومی پوشانده شده و در محل تاریک قرار گرفتند. در مرحله بعدی مادگی های خارج شده از ویال‌های شیشه‌ای سه بار با آب مقطر شستشو داده شده و سپس زیر بینوکولار قرار گرفتند. ابتدا با یک پنس باریک زوائد و کرک‌های موجود بر روی خامه و تخمدان پاک شدند خامه‌ها روی لام قرار گرفته و یک قطره گلیسرین یا آب جهت بهبود کیفیت نمونه‌ها به آن اضافه شد و سپس لامل روی آن قرار داده شده و با اندکی فشار با انگشت نمونه‌ها له شده و آماده مشاهده با میکروسکوپ گردید (۳۹). رشد لوله گرده ارقام مختلف با میکروسکوپ فلورسنس (مدل المپیاکوس و طول موج UV یعنی ۳۴۰ نانومتر) در چهار قسمت کلاله، ۱/۳ بالای خامه، وسط خامه و ۱/۳ پایین خامه مورد بررسی قرار گرفتند. تحت این شرایط کالوز به رنگ زرد روشن تا زرد مایل به سبز دیده می شود در حالی که بافت زمینه به رنگ خاکستری تا آبی مشاهده گردید.

ده تلاقی بر اساس همپوشانی گلدهی ارقام و ژنوتیپ‌ها صورت گرفت. در بخش باغ طرح آزمایشی بکار رفته طرح کاملاً تصادفی با ده تیمار (ده ترکیب تلاقی) با سه تکرار بود. همچنین، طرح آماری بخش آزمایشگاه طرح کاملاً تصادفی با ده تیمار (ده ترکیب تلاقی) در ده تکرار (حداقل ده مادگی از هر تلاقی) بود. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. ضرایب هبستگی صفات از نوع پیرسون بود.

جهت شناسایی آلل‌های ناسازگاری استخراج DNA، بررسی کیفیت و کمیت آن طبق روش یامانه و همکاران (۴۲) صورت گرفت. آغازگرها، چرخه‌های PCR، الکتروفورز محصول PCR، عکس‌بردای نوارها نیز به روش ساترلند (۳۵) و تائو (۳۶) انجام گرفت. آغازگرهای مورد استفاده و توالی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است.

در PCR با هر دو جفت آغازگر دیجنریت شرایط واسرشت‌سازی در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و ۳۱۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ده ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، توسعهٔ آغازگر در دمای ۶۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲:۳۰ دقیقه و به دنبال آن توسعهٔ نهایی انجام گردید.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش و توالی آن‌ها

Table 1- Primers and their sequences.

نوع آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence	نام آغازگر Primer name
رو به جلو Forward	5'-(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTTCTT C-3'	PaConsIF(FAM
معکوس Reverse	5'-GCC A(C/T)T GTT G(A/C)A CAA A(C/T)T GAA-3'	EMPC1consRD
رو به جلو Forward	5'-TCA-CMA-TYC-ATG-GCC-TAT-GG-3'	EM-PC2consFD
معکوس Reverse	5'-AWS-TRC-CRT-GYT-TGT-TCC-ATT-C-3'	EMPC3consRD

نتایج و بحث

نتـایج مربـوط بـه درصـد تشـکیل میـوه و مطالعـات میکروسکوپی

داده‌های مربوط به جدول تجزیه واریانس داده‌ها در جـدول ۲ نشان داد که بین تلاقی‌های مختلف از نظر درصـد تشـکیل میـوه اولیه، ثانویه و نهایی تفاوت معنی‌داری در سـطح یـک درصـد وجـود داشت. همچنین، مقایسه میانگین درصد تشکیل میوه اولیه، ثانویـه و نهایی در شکل ۱ نشان داد که بیشترین درصد تشـکیل میـوه اولیـه (۷۲/۲۱) و کمتـرین (۱/۸۰) بـه ترتیـب مربـوط بـه تلاقـی Montmorency x Meteor و Majarestani x Genotype 1 بود.

همچنین، بیشترین و کمترین درصد تشکیل میوه نهایی به ترتیب در تلاقـی‌هـای Montmorency x Mahalli (۱۵/۵ درصـد) و Montmorency x Genotype 1 (صفر درصـد) مشـاهده گردیـد. البته باید یادآور شد که دلیل کاهش شدید درصد تشکیل میوه نهایی در تلاقی‌ها دست کاری مـادگی‌هـا در مرحلـه اختـه کـردن و گـرده افشانی مصنوعی بوده است که به نوعی به مادگی‌ها تنش وارد می‌-کند. همچنین، شرایط بارندگی در زمان انجام تلاقی‌ها احتمـال زیـاد باعث کاهش بیشتر درصد تشکیل میوه نهایی شده است.

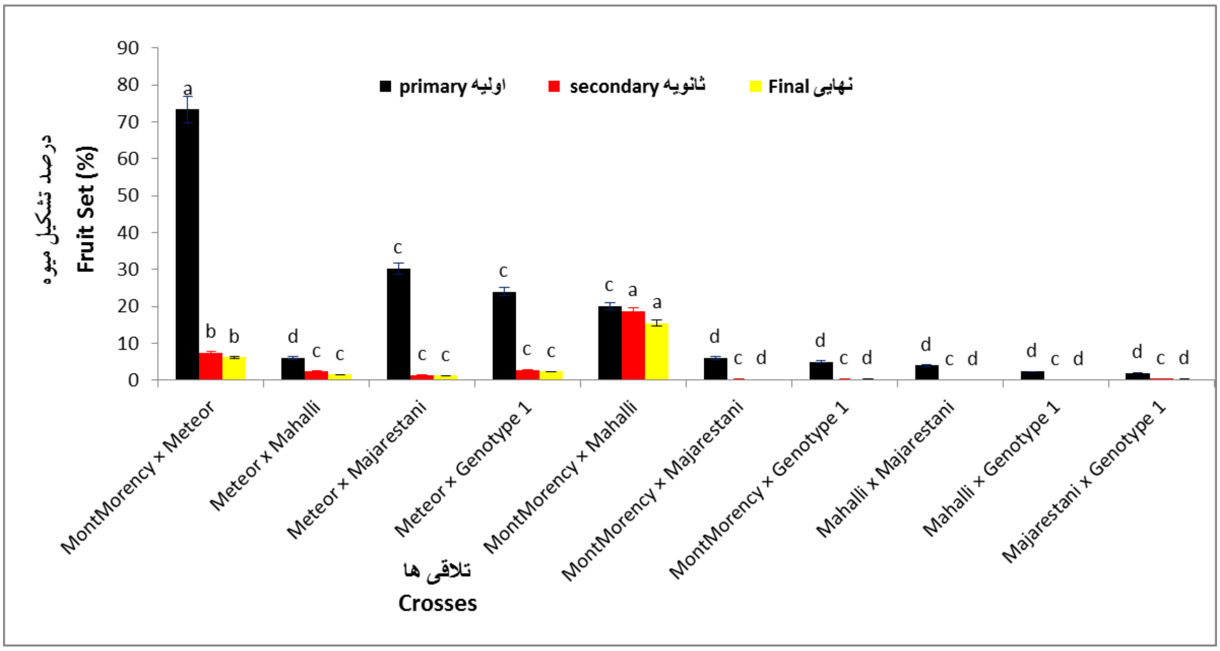
جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) **درصد تشکیل میوه در تلاقی‌ها**

Table 2- Analysis of variance (mean of square) **for fruit set in crosses.**

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	درصد تشکیل میوه Fruit set percentage: تعداد گل Flower number	اولیه Primary	ثانویه Secondary	نهایی Final
تلاقی Cross	9	1464.10**	1264.04**	67.17**	61.41**
خطا Error	20	112.40	42.90	2.17	3.8
ضریب تغییرات CV (%)		12.13	5.16	6.35	8.71

**: معنی‌دار در سطح یک درصد.

**; Significant in 1%.



شکل ۱- درصد تشکیل میوه اولیه، ثانویه و نهایی در تلاقی‌ها

Figure 1- Primary, secondary and final fruit set in crosses. (DMRT, *p≤0.01*)

اطلاعات مربوط به جدول تجزیه واریـانس داده‌هـا در جـدول ۳ نشان داد که بین تلاقی‌های مختلف از نظـر تعـداد گـرده در سـطح کلاله، درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله، تعداد لوله گرده در ابتدا، وسط و انتهای خامه و ابتدای تخمدان، تفاوت معنـی‌داری در سـطح یک درصد وجود داشت.

مقایسه میانگین تعداد گرده در سطح کلاله، درصد جوانه‌زنـی گرده در سطح کلاله، در شکل ۲ نشان داد کـه بیشـترین (۷۳/۳۳) و کمترین (۲/۰۰) تعداد لوله گرده در ابتدای تخمدان به ترتیب مربـوط به تلاقی‌های Meteore x Majarestani و Meteore x Mahalli بود. همچنین، بیشترین (۷/۲۵) و کمترین (۰/۱) تعداد لولـه گـرده در ابتـدای تخمـدان بـه ترتیـب مربـوط بـه تلاقـی‌هـای Mahalli x Majarestani و Meteore x Genotype 1 بـود (شـکل ۳). بـر اساس گزارش محققان زیادی ثابت شده است که هر چه تعداد لولـه گرده در قسمت‌های مختلف خامه بـویژه در ورودی تخمـدان بیشـتر باشد نشانگر سازگاری بهتر ارقام با همدیگر بوده و متعاقب آن باعث افزایش تشکیل میوه می‌گردد (۳۲) کـه در مطالعـه حاضـر نیـز ایـن پدیده به روشنی مشاهده گردید.

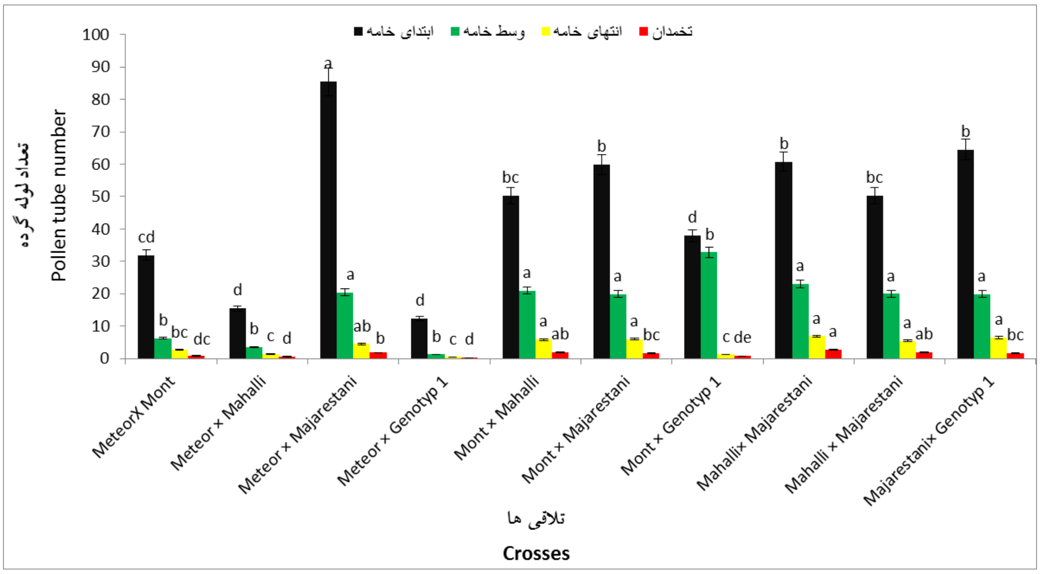
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس روند رشد لوله گرده در خامه در تلاقی‌ها

Table 3- Analysis of variance for the pollen tube growth pattern in the styles of crosses.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean square					
		تعداد گرده در سطح کلاله Pollen number on style	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	ابتدای خامه Style begin	وسط خامه Style middle	انتهای خامه Style end	تخمدان Ovary
تلاقی Cross	9	30438.10**	26984.30**	8641.50**	894.7**	64.3**	6.7**
خطا Error	20	750.80	495.90	712.20	30.83	8.70	.00
ضریب تغییرات CV (%)		21.30	20.40	27.70	29.90	8.40	5.70

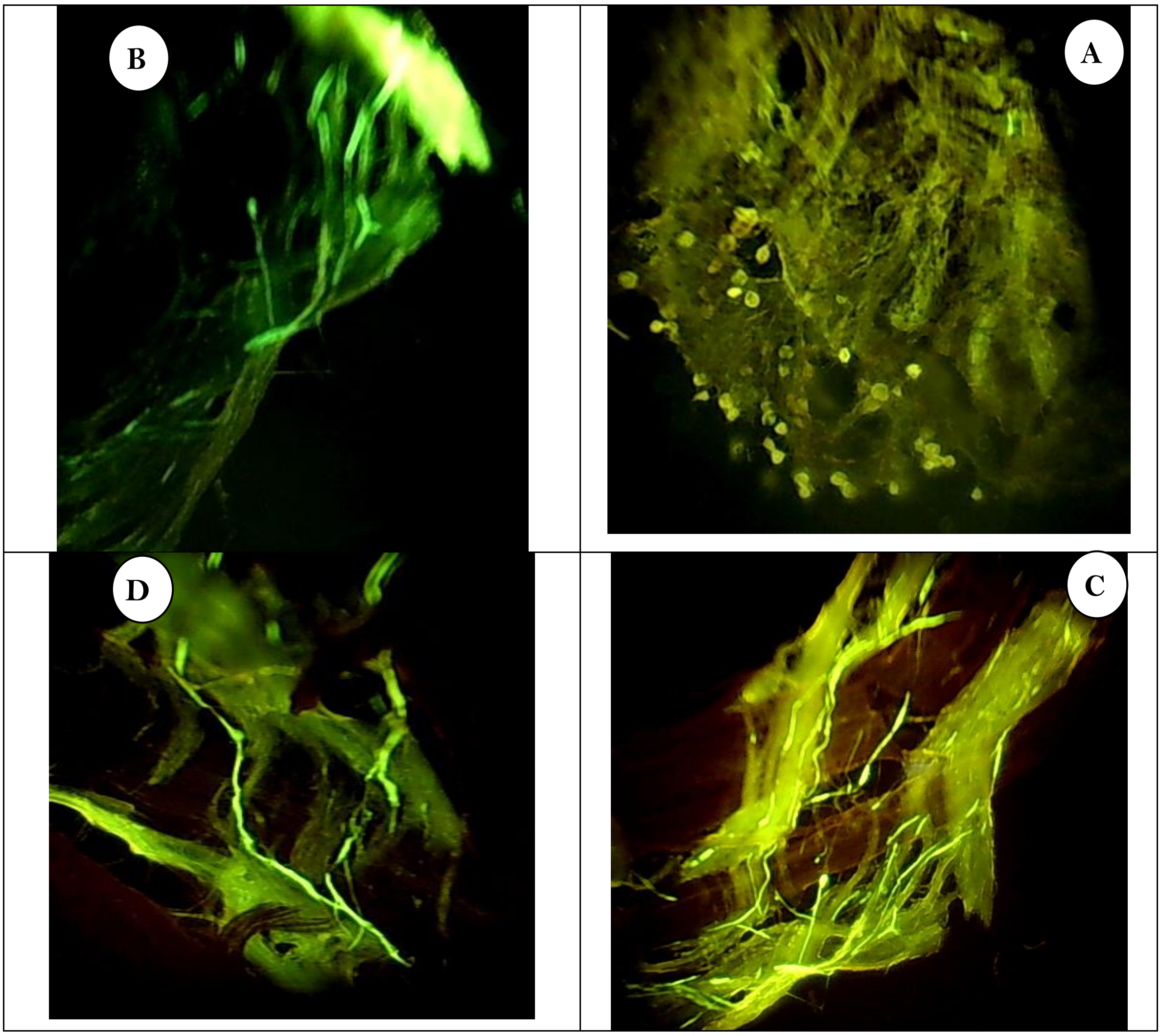
**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

**: Significant at 1% of probability level



شکل ۲- تعداد لوله گرده در قسمت‌های مختلف خامه در تلاقی‌ها

Figure 2- Pollen tube number in different parts of the pistils in crosses. (DMRT, *p≤0.01*)



شکل ۳- سطح کلاله (a)، اول خامه (b)، وسط خامه (c) و اول تخمدان (d) در تلاقی رقم 'متئور' با گرده ژنوتیپ ۱

Figure 3-A) Stigma surface, B) upper part of style, C) middle of style and D) ovary beginning, respectively in cross between 'Meteore' with pollen of genotype 1

جدول ضرایب همبستگی جدول ۵ بین درصد جوانه زنی دانه گرده در سطح کلاله و تعداد لوله گرده در قسمت-های مختلف خامه و تخمدان نشان داد که ضریب همبستگی بین (۰/۳۶ – ۰/۸۳) بود. همبستگی مثبت و بالایی بین آنها وجود داشت و بیشترین همبستگی بین تعداد گرده در وسط خامه و تعداد لوله گرده در ابتدای تخمدان (۰/۸۳) وجود داشت و کمترین همبستگی (۰/۳۶) بین درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله و تعداد لوله گرده در انتهای خامه وجود داشت. به عبارتی تعداد لوله گرده در وسط تخمدان بیشترین اثر در سازگاری گرده با مادگی را دارد.

نتایج واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

آغازگرهای دیجنریت اینترون اول (PaConsI-F/EM-PC1consRD)، در اکثر ارقام و ژنوتیپ‌ها دو آلل ناسازگاری را تکثیر کردند. هیچ آللی از رقم مجارستانی توسط این آغازگرها تکثیر نشد و فقط در ژنوتیپ یک سه آلل تکثیر شد. اندازه نوارها اکثراً کوچکتر از ۵۰۰ جفت باز بود که در محدوده ۱۰۰۰–۲۵۰ جفت باز بودند (جدول ۴). بطور کلی اندازه نوارهای حاصل از تکثیر آلل‌ها با استفاده از این آغازگرها خیلی نزدیک به هم بودند (شکل ۴)، لذا تخمین و تعیین آلل‌های خودناسازگاری مشکل بود. در این پژوهش آغازگرهای دیجنریت اینترون اول، در اکثر ارقام و ژنوتیپ‌ها دو آلل S خودناسازگاری تکثیر کردند. هر چند که در برخی سه آلل تکثیر شده بود ولی در هیچکدام همه چهار آلل آلبالو تکثیر نشده است و این نشانگر عدم توانایی این آغازگرها در تکثیر آلل چهارم بود. این نتایج با گزارش نتایج اورتگا و همکاران (۲۳) مطابقت داشت.

جدول ۵- ضرایب همبستگی مربوط به گرده و لوله گرده در خامه و تخمدان تلاقی‌ها

Table 5- Correlation value among pollen number and germination percentages and tube numbers in different parts of styles and ovary in crosses

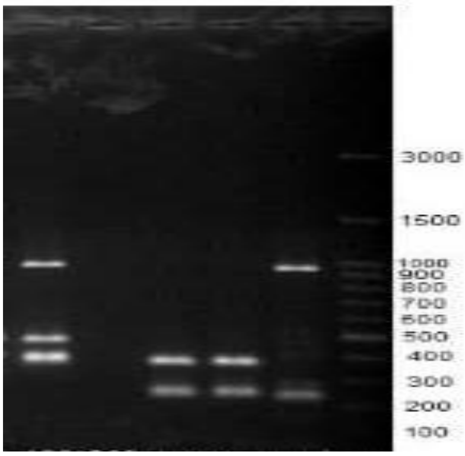
	تعداد گرده Pollen number	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	ابتدای خامه Style begin	وسط خامه Style middle	انتهای خامه Style end
درصد جوانه‌زنی Germination percentage	0.78**				
ابتدای خامه Style begin	0.74**	0.61**			
وسط خامه Style middle	0.73**	0.41**	0.82**		
انتهای خامه Style end	0.63**	0.36**	0.69**	0.78**	
تخمدان Ovary	0.54**	0.52**	0.67**	0.83**	0.76**

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

**: Significant at 1% of probability level.

برخلاف آغازگرهای دیجنریت اینترون اول، آغازگرهای اینترون دوم (EM-PC1consRD/EM-PC2consFD)، در اکثر ارقام و ژنوتیپ‌ها دو آلل ناسازگاری را تکثیر کردند که کوچکتر از ۱۰۰۰ جفت باز داشتند. اندازه نوارهای حاصل از تکثیر آلل‌ها با استفاده از این آغازگرها برخلاف آغازگرهای دیجنریت اینترون اول خیلی نزدیک به هم نبوده و تفاوت زیادی داشتند، لذا تخمین و تعیین آلل های خودناسازگاری در آنها در مقایسه با آغازگرهای قبلی راحت‌تر بود. در این پژوهش آغازگرهای دیجنریت اینترون دوم، در اکثر ارقام و ژنوتیپ‌ها دو آلل S خودناسازگاری تکثیر کردند. در هیچکدام همه چهار آلل آلبالو تکثیر نشده است و این نشانگر عدم توانایی این آغازگرها در تکثیر آلل چهارم بود.

جفت آغازگر (EM-Pc2consFD&EM-Pc3consRD)، در اکثر ارقام و ژنوتیپ‌ها سه آلل ناسازگاری را تکثیر کردند. ولی اندازه نوارها اغلب شبیه آغازگرهای اینترون اول بودند. بطور کلی اندازه نوارهای حاصل از تکثیر آلل‌ها با استفاده از این آغازگرها نیز خیلی نزدیک به هم بودند (جدول ۴)، لذا تخمین و تعیین آلل‌های خودناسازگاری مشکل بود. در این پژوهش آغازگرهای دیجنریت اینترون اول، در اکثر ارقام و ژنوتیپ‌ها دو آلل S خودناسازگاری تکثیر کردند. هر چند که در برخی سه آلل تکثیر شده بود ولی در هیچکدام همه چهار آلل آلبالو تکثیر نشده است و این نشانگر عدم توانایی این آغازگرها در تکثیر آلل چهارم بود.



شکل ٤- تکثیر آلل‌ها خودناسازگاری ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آلبالو با استفاده از آغازگرهای PaConsI-F/EM-PC1consRD

چاهک‌های روی ژل از راست به چپ به ترتیب شامل 'متئور'،'مونت مورنسی'،'محلی'،'مجارستانی' و ژنوتیپ یک می‌باشند.

Figure 4- S alleles amplified by PaConsI-F/EM-PC1consRD in the studied sour cherry cultivars and genotypes

Cultivars argument are 'Meteor', 'Mont Morency', 'Mahalli', 'Majarestani' and Genotype 1 from right to left.

با توجه به نتایج مربوط به درصد تشکیل میوه، تعداد لوله گرده در قسمت‌های مختلف خامه و نوارهای مربوط به آلل‌های ناسازگاری مشاهده شد که هیچ نوع ناسازگاری در بین ارقام و ژنوتیپ مورد مطالعه مشاهده نمی‌شود و نتایج هر سه روش همدیگر را تایید می کنند. بنابراین، این گیاهان بدون مشکل گرده‌افشانی، لقاح و تشکیل میوه در احداث باغات آلبالو می‌توانند بعنوان گرده‌زای مناسب برای همدیگر کشت شوند.

مطابق نتایج بدست آمده در این مطالعه؛ لانساری و آیزونی (۱۵)، برای اولین بار با مطالعه روند رشد لوله گرده در خامه با میکروسکوپ فلورسنت در تلاقی‌های دی‌آلل بین ارقام Tschrnokoka، Crisana، Meteore و Montmorency آلبالو و دو رقم ناسازگار گیلاس گزارش نمودند که برخی نتاج حاصل از تلاقی‌های ارقام خودبارور؛ خودناسازگاری نشان می‌دهند و این نشانگر این است که والدین این نتاج حامل تعداد زیادی آلل ناسازگاری فعال هستند که قبلا مورد توجه قرار نگرفته‌اند. همچنین، ایشان در این مطالعه ثابت نمودند که ارقام Tschrnokoka و Crisana خودناسازگار هستند ولی ارقام Meteore و Montmorency حالت نیمه خودناسازگاری دارند. پدیده متفاوتی که آنها گزارش کردند این بود که در مطالعه آنها توقف رشد لوله‌گرده در ارقام خودناسازگار گیلاس در خامه صورت گرفت. ولی در ارقام خودناسازگار آلبالو لوله‌های گرده در ابتدا سرعت رشد بالا و مشابه ارقام خودبارور داشتند ولی ۷۲ ساعت بعد از گرده‌افشانی لوله‌ها در خامه چند شاخه شده و جهت رشد آنها برعکس و به سمت کلاله برمی‌گردند. البته سرعت رشد لوله‌گرده در رقم مونت مورنسی بالاتر از متئور بود. سرعت رشد لوله های گرده گیلاس در خامه آلبالو بیشتر از سرعت رشد لوله‌های گرده خود آلبالو بود که این نتایج در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید.

جدول ٤- آلل‌های ناسازگاری تکثیر شده با جفت آغازگرها بر اساس اندازه نوارها (جفت باز)

Table 4- S alleles amplified with primers based on band size (base pair)

جفت آغازگرها Primer pairs	'متئور' 'Meteore'	'مونت مورنسی' 'Montmorency'	'محلی' 'Mahalli'	'مجارستانی' 'Majarestani'	ژنوتیپ ۱ Genotype 1
PaConsI-F/EM-PC1consRD	280/1000	290/370	295/380	-	370/440/500
EM-PC1consRD/EM-PC2consFD	1100/1300	800/1000	900/1200	1150/1250	1100
EM-Pc2consFD&EM-Pc3consRD	1050/890/620	600/700/880	950	490/680	570/870/1100

توبوت و همکاران (۳۸)، در ایستگاه ایست مالینگ انگلستان؛ سازگاری ۳۶ جمعیت از رقم Crisana (Kros) را با استفاده از استخراج و الکتروفورز پروتئین‌های خامه و PCR مطالعه کرده و گزارش نمودند که در زیموگرام حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های خامه در بیشتر نتاج سه نوار و در برخی دو و در برخی چهار نوار وجود داشت که هر کدام از آنها نشانگر یک آلل ناسازگاری می‌باشند که با PCR ثابت گردید.

لایسک و همکاران (۱۹)، آلل‌های ناسازگاری ۲۱ رقم از نقاط مختلف اروپا را از طریق تکثیر اینترون‌های اول و دوم ژن SRNase شناسایی کرده و ۱۵ آلل ناسازگاری شامل S1، 'S1، S4، S6، S6m، S9، S12، S13، 'S13، S26، S35، S36a، S36b و S36bc بودند بیشترین فراوانی مربوط به آلل S13 بود. همچنین، از بین ۲۱ رقم مورد مطالعه ۱۷ رقم خودبارور بودند. نتایج حاصل از این مطالعه باعث شد که در احداث باغات آلبالوی جدید در اروپا انتخاب ارقام گرده‌زا با دقت بیشتری صورت گیرد. در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی مربوط به اندازه نوار ۱۰۰۰ جفت باز بود.

تاکنون ۱۲ آلل ناسازگاری فعال و نه آلل ناسازگاری غیر فعال در آلبالو شناسایی شده‌اند که آلل‌های ناسازگار فعال شامل S1، S4، S6، S9، S12، S13، S14، S15، S26، S33، S34، و S35 هستند و آلل‌های ناسازگار غیر فعال شامل 'S1، S6m، S6mc، 'S13، S13m ، S36a، S36b، S36bc و S36b3 هستند. باید ذکر شود که آلل‌های ناسازگاری غیر فعال با پسوند پریم یا ام انگلیسی مشخص می‌شوند. و اکثر آنها از گونه *P. froticosa* به ارث رسیده اند (۱۱، ۳۰ و ۳۲). برخی از آلل‌های فوق در گیلاس نیز شناسایی شده‌اند و این نشانگر این است که این آلل‌ها از گیلاس به آلبالو منتقل شده‌اند. چون آلبالو دورگ بین گیلاس و گونه *P. froticosa* می‌باشد. همچنین، آلل‌های ناسازگار غیر فعال در آلبالو در گیلاس فعال هستند و این هم نشانگر این است که تتراپلوئید شدن آلبالو باعث غیر فعال شدن آلل‌های ناسازگاری در آلبالو شده است. بطور کلی پلی‌پلوئیدی باعث از بین رفتن خودناسازگاری گامتوفیتیک می‌شود. همچنین، افزایش یا کاهش ناگهانی دما باعث غیر فعال شدن آلل‌های ناسازگاری می‌شود. شاید در برخی سال‌ها که پس از سرمای دیررس بهاره در برخی درختان میوه خودناسازگار مثل بادام، گیلاس و آلبالو میوه محدودی تشکیل می شود همین پدیده باشد.

چهار آلل ناسازگاری شامل Sa، Sb، Sc و Sd در گونه *P. froticosa* شناسایی شده‌اند که اخیراً این آلل‌ها با نام‌های S26،

S33، S35، S36a، S36b، S36b2 و S36b3 مشهور هستند (۱۳). همچنین، یامانه (۳۶)، گزارش کرد که در همه ارقام آلبالو (خودبارور و خود نابارور) حداقل یک آلل فعال ناسازگاری گیلاس وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌ها در مطالعات مربوط به درصد تشکیل میوه و روند نفوذ لوله گرده به سمت تخمدان بهترین تلاقی 'محلی' X 'مونت مورنسی' بود که درصد تشکیل میوه همچنین، تعداد لوله گرده در قسمت‌های مختلف خامه و تخمدان در آنها بیشتر از سایر تلاقی‌ها بودند. این نتایج نشانگر سازگاری بهتر و اثر مثبت گرده رقم محلی روی رقم مجارستانی است که این رقم اکثر درختان تحت کشت باغات آلبالو در ایران را تشکیل می‌دهد و رقم محلی می‌تواند بعنوان بهترین گرده‌زا برای آن در نظر گرفته شود. همچنین، تکثیر آلل‌های ناسازگاری توسط آغازگرهای دیجنریت جنس *Prunus* نشان داد که هر جفت آغازگر حداکثر سه نوار مربوط به آلل‌های ناسازگاری را تکثیر نمود و هیچکدام از جفت آغازگرها نتوانستند هر چهار آلل ناسازگاری را تکثیر کنند. بطور کلی، با توجه به اینکه در هیچکدام از پنج رقم و ژنوتیپ همه چهار آلل باهم یکسان نبودند نشانگر تایید نتایج مربوط به تشکیل میوه و روند رشد لوله گرده و نهایتاً سازگاری بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود که در نتیجه می‌توان بدون هیچ محدویتی این ارقام را بعنوان گرده‌زای مناسب همدیگر در احداث باغات آلبالو باهم کشت نمود. همچنین، با توجه به اهمیت پرورش آلبالو و تولید و ورود ارقام جدید آن جهت اطمینان از گرده‌افشانی و تشکیل میوه بهتر است که از روش نوین مولکولی جهت شناسای روابط سازگاری آنها استفاده نمود.

منابع

1- Atlagić J., Terzić S., and Marjanović-Jeromela A. 2012. Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species. Industrial crops and products 35(1): 88-91.
2- Ayanoglu H., Bayazit S., Inan G., Bakir M., Akpinar AE Kazan K., and Ergul A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region. Scientia Horticulterae 114: 263-267.
3- Chen X., Huairui Shu., and Xuesen Chen. 2004. Studies on self--incompatibility in stone fruit trees. Chinese Bulletin of Botany 21: 755-764.
4- Cropotova J., Tylewicz U., Cocci E., Romani S., and Dalla Rosa M. 2016. A novel fluorescence microscopy approach to estimate quality loss of stored fruit fillings as a result of browning. Food Chemistry 194: 175-183.
5- Dafni Amots., Michael Hesse., and Ettore Pacini. 2012. Pollen and pollination: Springer Science & Business Media.
6- Eftekhari M., and Sharafi Y. 2020. Microscopic study of fertilization and fruit set in apricot cultivars sprayed by zinc. Journal of Horticultural Plant Nutrition 2: 1-14.
7- Eftekhari M., and Sharafi Y. 2020. Microscopic study of the effect of Boron foliar application on pollen tube penetration and fruit set in apricot cultivars. Journal of Horticultural Plant Nutrition 3: 119-130.
8- Fahrni C.J. 2007. Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals. Current Opinion in Chemical Biology 11(2): 121-127.
9- FAO. 2018. FAO statistical database. http://apps.fao.org.(visited 10 january 2018)
10- Gu Chao., J Wu., Y-H Du., Y-N Yang., and S-L Zhang. 2013. Two different *Prunus* S fb alleles have the same function in the Self-incompatibility reaction. Plant Molecular Biology Reporter 31(20): 425-34.
11- Gu Chao, Jun Wu., Shu-Jun Zhang., Ya-Nan Yang., Hua-Qing Wu., M Awais Khan., Shao-Ling Zhang, and Qing-Zhong Liu. 2011. Molecular analysis of eight S fb alleles and a new S fb-like gene in *Prunus Pseudocerasus* and *Prunus* speciosa. Tree genetics & Genomes 7(5): 891-902.
12- Halasz J., Hegdus A. and pedryec A. 2006. Review of the molecular background of self-incompatibility in Rosaceae fruit trees. Journal of Horticultural Sciences 12: 7-19.
13- Hauk N., Yamane H., Tao R. and Iezzoni A.F. 2002. Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Sex Plant Reproduction 16: 14-19.
14- Hegedűs A., Lénárt J., and Halász J. 2012. Sexual incompatibility in Rosaceae fruit tree species: Molecular interactions and evolutionary dynamics. Biologia Plantarum 56(2): 201-09.
15- Hegedus A., Szabo Z., Nyeki J., Halasz J. and Pedryec A. 2006. Molecular analysis of S-haplotypes in peach, a self-compatible *Prunus* species. Journal of American Society. Horticultural Sciences 131: 738-743.
16- Kubitscheck U. 2017. Fluorescence microscopy: from principles to biological applications: John Wiley & Sons.
17- Lansari A., and Iezzoni A. 1990. A preliminary analysis of self incompatibility in Sour cherry, Hortscience 25(12): 1636-1638.
18- Lech W. and Tylus K. 1983. Pollination, fertilization, and fruit set of some sour cherry varieties. Acta Horticulturae 139: 33–39.

19- Lisek A., Danuta Kucharska, Agnieszka Głowacka., and Elżbieta Rozpara. 2017. Identification of S-haplotypes of European cultivars of sour cherry, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 34(12): 163-168.
20- Losada J.M. and Herrero M. 2014. Glycoprotein composition along the pistil of (Malusdomestica) and the modulation of pollen tube growth. BMC Plant Biology 14(1): 1-7.
21- Mable B.K. 2004. Polyploidy and self-compatibility: Is there an association? New Phytologist 162: 803–811.
22- Makovics-Zsohár N., and Halász J. 2016. Self-incompatibility system in polyploid fruit tree species- A review, The International Journal of Plant Reproductive Biology 8(1): 24-33.
23- Mularczyk-Oliwa M., Bombalska A., Kaliszewski M., Włodarski M., Kopczyński K., Kwaśny M., Szpakowska M., and Trafny E.A. 2012. Comparison of fluorescence spectroscopy and FTIR in differentiation of plant pollens. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 97: 246-254.
24- Nathanael R., Hauck, Hisayo Yamane, Ryutaro Tao., and Amy F. Iezzoni. 2006. Accumulation of nonfunctional S-haplotypes results in the breakdown of gametophytic Self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. Genetics Society of America 172: 1191–1198.
25- Ortega E., Martinez-Garca P., Dicenta F., Boskovic R. and Tobutt K.R. 2002. Study of self-compatibility in almond progenies from self-fertilization by florescence microscopy and stylar ribonuclease assay. Acta Horticulturae 591: 229-232.
26- Radunić M., Jazbec A., Ercisli S., Čmelik Z., and Ban S.G. 2017. Pollen-pistil interaction influence on the fruit set of sweet cherry. Scientia Horticulturae 224: 358-366.
27- Sabbaghpoor Heris J., Sharafi Y., and Buzari B. 2020 Investigation of the Compatibility among some Sour Cherry Cultivars and Genotypes in Iran. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 21(1): 47–58.
28- Salesses G., and Bonnet A. 1994. Citological studies of tetra-, hepta-, and octoploid interspecific hybrids between *P. cerasifera, P. spinosa and P. domestica.* Acta Horticulturae 359: 26–32.
29- Schneckenburger H. 2005. Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. Current Opinion in Biotechnology 16(1): 13-18.
30- Sedgley M. 1990. Flowering of deciduous perennial fruit crops. Horticultural Reviews 12: 223-264.
31- Sharafi Y. 2019. Effects of zinc on pollen gamete penetration to pistils in some apple crosses assessed by fluorescence microscopy. Caryologia 72: 63-73.
32- Sharafi Y., and Raina M. 2020. Effect of boron on pollen attributes in different cultivars of *Malus domestica* L. National Academy Science Letters 43(4): 399-403.
33- Sharafi Y., Talebi S.F., and Talei D. 2017. Effects of heavy metals on male gametes of sweet cherry. Caryologia 70: 166-173.
34- Sharafi Y., Talebi S.F., and Talei D. 2017. Effects of heavy metals on male gametes of sweet cherry, Caryologia 70: 166-173.
35- Sutherland Bruce G., Kenneth R., Tobutt, and Timothy P Robbins. 2008. Trans-specific S-Rnase and S fb alleles in *Prunus* Self-incompatibility haplotypes. Molecular Genetics and Genomics 279(95): 65-78.
36- Tao Ryutaro, Akiko Watari., Toshio Hanada., Tsuyoshi Habu., Hideaki Y., Masami Y., and Hisayo Y. 2007. Self-compatible peach (*Prunus Persica)* has mutant versions of the S haplotypes found in Self-incompatible *Prunus* Species. Plant Molecular Biology 63(1): 109-23.
37- Tatsuya Tsukamoto., Nathanael R., Hauck, Ryutaro Tao, Ning Jiang and Amy Iezzoni F. 2010. Molecular and genetic analyses of four nonfunctional S haplotype variants derived from a common ancestral S haplotype identified in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Genetics Society of America 184: 411–427.
38- Tobutt K.R., Boskovic R., Cerovic´·R., Sonneveld T., and Rusic D. 2004. Identification of incompatibility alleles in the tetraploid species sour cherry. Theor Appl Genet 108: 775–785.
39- Tsukamoto T., Hauck N.R., Tao R., Jiang N., and Iezzoni A. F. 2006. Molecular characterization of three nonfunctional haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). Plant Molecular Biology 62: 371–383.
40- Tsukamoto T., Hauck N.R., Tao R., Jiang N., and Iezzoni A.F. 2008. Genetic and molecular characterization of three nonfunctional haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). Journal of Experimental Botany 59(11): 3169-3185.
41- Tsukamoto T., Hauck N.R., Tao R., Jiang N., and Iezzoni A.F. 2008. Molecular and genetic analyses of four nonfunctional S haplotype variants derived from a common ancestral S haplotype identified in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Genetics Society of America 411-427.
42- Yamane H., Kazuo Ikeda., Nathanael R., Hauck, Amy F. Iezzoni and Ryutaro Tao. 2003. Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele. Journal of Experimental Botany 54(392): 2431-2437.
43- Yeloff D., and Hunt C. 2005. Fluorescence microscopy of pollen and spores: a tool for investigating environmental change. Review of Palaeobotany and Palynology 133(3): 203-219.

Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.3, Fall 2020, P. 427-438
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۴۳۸-۴۲۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Compatibility Relationships of some Sour Cherry Cultivars and Genotypes Using PCR and Florescence Microscopy

A. Joulani[1]- Y. Sharafi[2*]- J. Sabbaghpour Heris[3]
Received: 09-04-2019
Accepted: 22-09-2020

Introduction: Sour cherry (*Prunus cerasuc* L.) is one of the most important stone fruit of Rosaceae family which have a high nutritional value. Based on FAO statistics, Iran was ranked the 3rd to 6th among the main sour cherry producer countries in the world. Most of the sour cherry cultivars are self-compatible, but self-incompatible cultivars have been reported currently. Allotetraploidy of sour cherry complicates the self-incompatibility segregation in the progeny, so this studies have been less accomplished in Iran. The sour cherry is an allotetraploid species which possibly stand up as a result of usual hybridization between the dwarf cherry *P. fruticosa* and sweet cherry *P. avium*. Similar to other species of the *Prunus*, the phenomenon of gametophytic self-incompatibility (GSI) happens in sour cherry. It prevents self-fertilization and facilitate fertilization with pollen of other genotypes within same species. Self-incompatibility consists of arresting pollen-tube growth in the pistil if the pollen tube contains the same S-allele that is present in the pistil. The phenomenon of self-incompatibility in plants of Rosaceae family is controlled by two genes at the S-locus. The specificity of the pistil is encoded by a gene responsible for the synthesis of the ribonuclease protein (S-RNase), whereas the specificity of the pollen is controlled by the gene encoding an F-box protein (S-haplotype-specific F-box protein – SFB) 3a). The tightly linked genetic unit of the pistil S-allele (SRNase) and pollen S-allele is called S-haplotype.

Materials and Methods: In the present study, pollen-pistil compatibility relationships among some sour cherry cultivars and selected genotypes were investigated by controlled pollination and pollen tube penetration by fluorescence microscopy. Cultivars were include ‘Meteor’, ‘Mont Morency’, ‘Majarestani’ and ‘Mahalli’ so, genotype1 were selected. After controlled pollination fruit setting was studied and the pollen tubes growth along the style was studied using fluorescent microscope. Crosses were selected based on synchronized flowering time among cultivars and genotypes and included ‘Mont Morency’ × ‘Meteor’, ‘Meteor’ × ‘Mahalli’, ‘Meteor’ × ‘Majarestani’, ‘Meteor’ × ‘Genotype 1’, ‘Mont Morency’ × ‘Mahalli’, ‘Mont Morency’ × ‘Majarestani’, ‘Mont Morency’ × ‘Genotype 1’, ‘Mahalli’ × ‘Majarestani’, ‘Mahalli’ × ‘Genotype 1’ and ‘Majarestani’ × ‘Genotype 1’, respectively**.**

For each cross, 2 branches were randomly selected in female cultivars in winter. On each branch, including 30 floral buds at ‘balloon stage’ were tagged and bagged to prevent the entrance of any foreign pollen. On the day of anthesis, ready-to-dehisce anthers were collected from male cultivar, maintained on a moist filter paper in petri plates at 4 ºC in refrigerator till they dehisce. Pollens from these anthers were used as a source of male gametes later. Once stigma turned receptive, cross-pollination treatments were carried out in the field as designed scheme for 12 successive days. After every 24 hrs. up to 120 hrs. post-pollination, 12 pistils per treatment were fixed in FAA (formaldehyde/glacial acetic acid/70% alcohol in the ratio of 1:1:18) for 24 hrs. Followed by washings with water to remove traces of alcohol, if any, and cleared in 5% KOH at 60 ºC for fluorescence microscopy. Staining regime, as described in Sabbaghpour *et al.* (2020) the number of pollen tubes in the upper and mid-parts of the style and in the ovary was employed to enable visualization of the pollen germination on the stigma. Percentage of pollen germination was determined as the proportion of pollen grains that germinated on the stigma to the total number present on a scale of 100. Pollen tube number at three levels was calculated as an average of 5 (n=10). For an easy understanding of growth pattern of pollen tubes inside the style and ovary, the stylar portion, which measures 1.8 ± 0.07 cm on an average, was divided into two parts: the middle and the base. A single, longitudinal incision was then carefully given on one portion of the style using a fine needle and made wide open. Pollen tubes inside the style were critically observed under fluorescence microscope at 100x magnification. Number of them was carefully recorded and data generated for different experimental sets.

Results and Discussion: Results showed that maximum pollen tube number penetrated to the ovary and final fruit set were observed in cross ‘Mahalli’×‘Majarestani’. Also, minimum pollen tube in the ovary and final fruit

1, 3 and 2- M.Sc. Students of Pomology and Assistant Professor, Departement of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran, Respectively
(*- Corresponding Author Email: y.sharafi@shahed.ac.ir)

set were observed in 'Meteor'×'Mahalli' and 'Meteor'×'Genotype 1' crosses.

Conclusion: Based on the obtained results cross-incompatibility was not observed among the studied cultivars and genotypes. Therefore, they could be planted in the sour cherry breeding programs and orchards establishment based on their blooming time.

Keywords: Florescent microscopy, Pollen, Pollination, Self-incompatibility, Sour cherry